

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 19 February 1998 (19.02.98)	
International application No.: PCT/EP97/04353	Applicant's or agent's file reference: P28696PC-Zie
International filing date: 11 August 1997 (11.08.97)	Priority date: 12 August 1996 (12.08.96)
Applicant: VOLLENBROICH, Dirk et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
03 February 1998 (03.02.98)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 7/06</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/06744</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. Februar 1998 (19.02.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/04353 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. August 1997 (11.08.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 33 684.8      12. August 1996 (12.08.96)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> VOLLENBROICH, Dirk [DE/DE]; Allerstrasse 6, D-12049 Berlin (DE). VATER, Joachim [DE/DE]; Nibelungenstrasse 14c, D-14109 Berlin (DE). PAULI, Georg [DE/DE]; Lützowstrasse 51f, D-10785 Berlin (DE). KAMP, Roza, Maria [DE/DE]; Knesebeckstrasse 9a, D-14167 Berlin (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> ZIEBIG, Marlene, K.; Gulde Hengelhaupt Ziebig, Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> INACTIVATING PROCESS FOR LIPID ENVELOPPED VIRUS, AND NEW ANTIVIRUS LIPOPEPTIDES <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR INAKTIVIERUNG VON LIPIDUMHÜLLTEN VIREN MIT LIPOPEPTIDEN UND NEUE ANTIVIRALE LIPOPEPTIDE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to an extremely efficient inactivating process for lipid envelopped virus such as Herpes virus and retrovirus in - mainly pharmaceutical - biological or biotechnological products and in cell cultures, wherein a cyclical lipopeptide or a lipopeptide mixture or salts or esters thereof are added in certain concentrations. It appeared that lipopeptides have a surprisingly strong inactivating power on lipid envelopped virus and the additional advantage of very low vivo-toxicity, such that eliminating the inactivation agent in pharmaceutical products would no longer be necessary. The invention relates also to new antiviral lipopeptides pertaining to the surfactine group.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft ein äußerst effizientes Verfahren zu Inaktivierung von lipidumhüllten Viren, wie z.B. Herpes- oder Retroviren in biologischen oder biotechnologischen - insbesondere pharmazeutischen - Produkten und in Zellkulturen, indem ein zyklisches Lipopeptid oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze oder Ester in bestimmten Konzentrationen zugesetzt werden. Es hat sich gezeigt, daß Lipopeptide ein überraschend hohes Inaktivierungspotential für lipidumhüllte Viren aufweisen und daneben den Vorteil einer sehr geringen in vivo-Toxizität bieten, wodurch der Schritt der Entfernung des Inaktivierungsmittels aus den pharmazeutischen Produkten oder aus der Zellkultur entfallen kann. Gegenstand der Erfindung sind auch neue antivirale Lipopeptide, die zu den Surfactinen gehören.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

---

10        Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren mit  
         Lipopeptiden und neue antivirale Lipopeptide

---

### BESCHREIBUNG

15

Die Erfindung betrifft ein äußerst effizientes Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren, wie z.B. Herpes- oder Retroviren, in biologischen oder biotechnologischen - insbesondere pharmazeutischen -  
20        Produkten und in Zellkulturen, indem ein zyklisches Lipopeptid oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze oder Ester in bestimmten Konzentrationen zugesetzt werden. Es hat sich gezeigt, daß Lipopeptide ein überraschend hohes Inaktivierungspotential für  
25        lipidumhüllte Viren aufweisen und daneben den Vorteil einer sehr geringen in vivo-Toxizität bieten, wodurch der Schritt der Entfernung des Inaktivierungsagenzes aus den pharmazeutischen Produkten oder aus der Zellkultur entfallen kann. Gegenstand der Erfindung sind auch neue  
30        antivirale Lipopeptide, die zu den Surfactinen gehören.

35

Spätestens mit der AIDS-Epidemie ist die Erkenntnis in das Bewußtsein der breiten Öffentlichkeit gerückt, daß nicht nur HI-Viren sondern eine Vielzahl humanpathogener Erreger z.B. durch Bluttransfusionen, Pharmazeutika,

Transplantationen usw. übertragbar sind. Generell muß heutzutage jedes aus biologischem Material hergestellte oder damit in Berührung gekommene Pharmakon als potentiell mikrobiell bzw. viral kontaminiert eingestuft und die Infektionssicherheit nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Herstellung von Pharmaka ist das Infektionsrisiko durch unterschiedliche mikrobielle Verunreinigungen nochmals gestiegen. Bei der biotechnologischen Herstellung von Pharmazeutika werden häufig animale oder humane Zelllinien verwendet. Besonders bei diesen Zellen können Virusinfektionen durch endogene Viren, latente Virusinfektionen oder Kontaminationen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Die Infektionssicherheit von biotechnologischen Pharmazeutika, z.B. Impfstoffen, monoklonalen Antikörpern, Hormonen oder rekombinanten Proteinen erfordert daher die Entfernung jeglicher infektiöser, nicht erwünschter Partikel, was grundsätzlich mit beträchtlichen Verlusten an Forschungszeit und -mitteln bzw. Produktivität verbunden sein kann. Die Virussicherheit von Blut und Blutprodukten kann nur durch Prüfung und Selektion der Blutspenden in Kombination mit der Evaluierung und prophylaktischen Anwendung von wirkungsvollen und zuverlässigen Virusinaktivierungs- und Viruseliminierungsverfahren gewährleistet werden.

Zur Inaktivierung und Eliminierung von Viren aus pharmazeutischen Produkten werden verschiedenartige Methoden einzeln oder in Kombination genutzt. Bei strukturell einfachen und stabilen Produkten kommen chromatographische Methoden, pH-"shift", Extraktion und Fraktionierung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Salzpräzipitation, Hitzebehandlung und Filtrationstechniken zum Einsatz [Rabenau & Doerr (1990) Die Infektionssicherheit biotechnologischer Pharmazeutika aus virologischer

Sicht, S. 58, GIT VERLAG GmbH, Darmstadt]. Bei empfindlichen oder komplexen biologischen Materialien werden häufig antiviral wirkende Substanzen eingesetzt. Folgende Methoden kommen u.a. zum Einsatz:

- 5 • kombinierte Anwendung von Lösungsmitteln (z.B. Etherextraktion) und synthetischen Detergenzien (z.B. Triton X-100) [B. Horowitz et al. (1985) Transfusion 25 516-522],
- 10 • Einsatz von  $\beta$ -Propiolacton in Kombination mit UV-Licht sowie Methylenblau in Kombination mit einer Photoaktivierung [W. Stephan (1989) S. 122-127 in: J.-J. Morgenthaler (Ed.); Virus inactivation in plasma products.; Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.; No. 56; Karger Basel],
- 15 • Pasteurisierung von flüssigem Material [T. Nowak (1992) Biologicals 20 83-85],
- Erhitzung von lyophilisiertem Material [D. Piszkiwicz et al. (1989) S. 44-54 in: J.-J. Morgenthaler (Ed.); Virus Inactivation in plasma products.; Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.; No. 56; Karger Basel],
- 20 • Bestrahlung mit Gammastrahlen (z.B. Cobalt-60) [B. Horowitz et al. (1988) Transfusion 25 523-527].

25 In der Literatur werden eine Reihe von Virusinaktivierungsverfahren für Blutprodukte, insbesondere von humanem Blutplasma, beschrieben. So offenbart A.M. Prince in US 4.591.505 ein Inaktivierungsverfahren für Hepatitis B-Viren, bei dem Alkohol und als virusinaktivierendes Agens entweder ein nichtionisches Detergenz oder Ether oder ein Gemisch aus  
30 beiden den Blutprodukten zugesetzt wird. Als nichtionische Detergenzien kommen Polyoxyethylenderivate oder Sulfobetaine zur Anwendung.

35 B. Horowitz beschreibt in US 4.841.023 und in Vox-Sang. 54: 14 - 20 (1988), S. Karger AG, Basel, die

Inaktivierung von lipidenthaltenden Viren in Blutprodukten durch Fettsäuren und in US 4.613.501 durch C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-Oleinsäure.

5 Ein Verfahren zur Herabsetzung unerwünschter Aktivitäten wie Pyrogenität, Hepatitis-Infektiösität und Aggregation in biologischen und pharmazeutischen Produkten, insbesondere auch Blutprodukten, durch Behandlung mit nicht-denaturierenden Amphiphilen, wie nicht-ionischen  
10 Tensiden (z.B. Tween 80) wird von E. Shanbrom in EP 0 050 061 offenbart.

Die Inaktivierung und Eliminierung von Viren aus Zellkulturen erfolgt durch die Anwendung von antiviralen  
15 Substanzen, die in der Regel die Virusreplikation hemmen.

Keines der bisher eingesetzten Inaktivierungsverfahren kann mit Sicherheit alle Viren inaktivieren oder eliminieren, die in biologischem Material vorkommen  
20 können.

Verfahren wie die Pasteurisierung oder die Hitzebehandlung benötigen in der Regel die Anwendung von Stabilisatoren; zudem besteht das Problem der Denaturierung von Proteinen. Die Anwendung von  
25 Lösungsmitteln und synthetischen Tensiden, angesehen als geeignet zur Inaktivierung lipidumhüllter Viren, konnte bisher durch schwankende Ergebnisse in den Inaktivierungskinetiken oder durch fehlende systematische Untersuchungen bedingt durch die hohe Toxizität der  
30 Substanzen in Zellkulturen nicht als vollständig sicher beurteilt werden. Bei einer Vielzahl von biotechnologischen Produkten sind aufgrund der Struktur oder der Stabilität aufwendige Reinigungen oder eine Inaktivierung mit produktschädigenden oder zytotoxischen  
35 antiviralen Substanzen wie Lösungsmitteln nicht möglich.



Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein schonendes Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren in biologischen oder biotechnologischen Produkten und in Zellkulturen zur Verfügung zu stellen, mit dem diese Produkte oder Zellkulturen sehr schnell und effektiv virusfrei gemacht werden können, ohne daß die Produkte denaturieren oder die Zellkulturen in ihrer Produktivität beeinträchtigt werden. Das Verfahren soll auch die Behandlung temperaturlabiler Produkte ermöglichen und nicht mit Substanzen arbeiten, die in vivo toxisch sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch den Einsatz von zyklischen  $\beta$ -Hydroxyfettsäure- und  $\beta$ -Aminofettsäurehaltigen Peptiden (Lipopeptiden) gelöst. Es hat sich gezeigt, daß die Lipopeptide ein überraschend hohes Inaktivierungspotential für lipidumhüllte Viren aufweisen und damit hervorragend zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe eingesetzt werden können. Lipopeptide erwiesen sich teilweise wesentlich wirksamer als die bisher zur Inaktivierung von Viren eingesetzten synthetischen Tenside. Daneben sind sie leicht biologisch abbaubar und besitzen eine wesentlich geringere in vivo-Toxizität als die synthetischen Tenside. Gegenüber herkömmlichen antiviralen Substanzen haben die erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide den Vorteil, daß sie thermisch stabil und gut wasserlöslich sind.

Aus der Literatur ist bekannt, daß zwei [Ile<sup>7</sup>] und [Leu<sup>7</sup>] Surfactine, die zu den Lipopeptiden gehören, moderate Anti-HIV-1-Aktivität zeigen (H. Itokawa et al., Chem. Pharm. Bull. 42, 604 - 607 (1994)). Pumilacidine werden von N. Naruse et al. in Journal of Antibiotics, Japan XLIII 267 - 280 (1989) als antiviral wirksam gegen das Herpes-simplex-Virus (HSV-1) beschrieben. In keiner der beiden Arbeiten finden sich jedoch Hinweise auf das beträchtliche Inkaktivierungspotential dieser Substanzen, das eine umfassende Inaktivierung von lipidumhüllten

Viren mit geringen Konzentrationen in kürzester Zeit erlaubt.

5 So ist das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß den biologischen oder biotechnologischen Produkten ein Lipopeptid oder dessen Salz oder Ester oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze oder Ester in einer Gesamtkonzentration von 1 - 100  $\mu\text{M}$ , vorzugsweise 1 - 80  $\mu\text{M}$ , zugesetzt werden und  
10 die Inaktivierung bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min bis maximal 2h durchgeführt führt, wobei bereits nach 30 min ca. 99% der Viren inaktiviert sind. Bedingt durch die sehr geringe in vivo-Toxizität der erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide ist es auch möglich, diese  
15 Inaktivierungssubstanzen in den o.g. Konzentrationen in den pharmazeutischen Produkten zu belassen. Nach erfolgter Inaktivierung können die eingesetzten Lipopeptide jedoch auch durch „reversed phase“-HPLC an  $\text{C}_{18}$ -Säulen oder Adsorptionschromatographie an Silicagel-Säulen aus den Produkten entfernt werden.  
20

Da die erfindungsgemäß eingesetzten Lipopeptide thermisch stabil sind, kann das Inaktivierungsverfahren in Abhängigkeit von der thermischen Stabilität der zu  
25 behandelnden Produkte auch bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, vorzugsweise bei 30 - 60°C. Es hat sich gezeigt, daß die Inaktivierungsleistung linear von der Temperatur abhängig ist. So bewirkt eine Steigerung der Temperatur um 10°C bereits einen Anstieg der  
30 Inaktivierungsrate um den Faktor 2,4, so daß die Virusinaktivierung bei 30 - 60°C mit den genannten Konzentrationen schon innerhalb von 5 - 30 min möglich ist. Es ist generell auch möglich, bei tieferen Temperaturen bis zu 0°C die Viren zu inaktivieren, wobei dies jedoch je nach  
35 Spezies länger als 2 Stunden dauern kann.

Erfindungsgemäß ist die Virusinaktivierung in Zellkulturen dadurch gekennzeichnet, daß dem serumfreien Kulturmedium ein Lipopeptid oder dessen Salz oder Ester oder ein Gemisch von Lipopeptiden oder deren Salze oder Ester in einer Gesamtkonzentration von 1 - 65  $\mu$ M, vorzugsweise von 1 - 50  $\mu$ M zugesetzt werden. Wird mit serumhaltigem Kulturmedium gearbeitet, das bis zu 5 Vol.-% Serum, z.B. FKS, beinhaltet, so beträgt die zur vollständigen Inaktivierung notwendige Lipopeptidkonzentration von 10 - 100  $\mu$ M, vorzugsweise von 30 - 90  $\mu$ M.

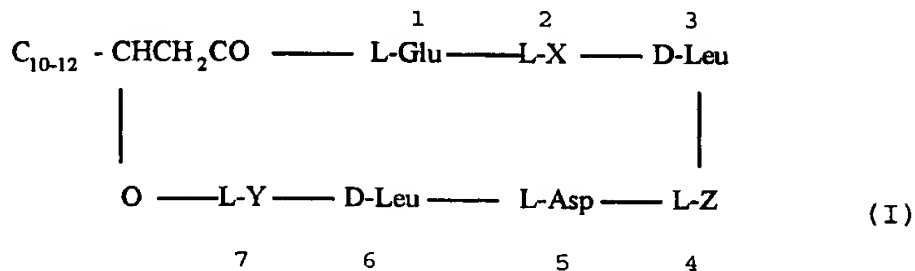
Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren kann in einem breiten pH-Bereich von 4 - 9, vorzugsweise von 5,5 - 8, durchgeführt werden.

Im Inaktivierungsverfahren der Erfindung können natürlich vorkommende, chemisch synthetisierte, gentechnisch hergestellte und gentechnisch modifizierten zyklischen Lipopeptide eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten zyklischen Lipopeptide können nach bereits beschriebenen und dem Fachmann bekannten Verfahren leicht hergestellt werden. Zahlreiche Lipopeptide werden u.a. vom Mikroorganismus *Bacillus subtilis* *in vivo* gebildet und in das umgebende Medium in hohen Konzentrationen sekretiert, aus dem sie dann isoliert werden können.

Bei den Viren, die mit den erfindungsgemäßen Verfahren inaktiviert werden können, handelt es sich vor allem um Herpes-Viren, vorzugsweise HSV-1, HSV-2, BHV-1, SHV-1, Immundefizienz-Viren, vorzugsweise HIV-1, HIV-2, SIV<sub>agm</sub>, das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) und das Semliki-Forest-Virus (SFV). Aber auch andere lipidumhüllte Viren lassen sich erfindungsgemäß effektiv inaktivieren.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden zur Inaktivierung die Lipoheptapeptide der allgemeinen Formel I, die auch als Surfactine bezeichnet werden, deren Salze, Ester oder deren Gemische eingesetzt



wobei in der Formel I X und Y für die Aminosäuren Leu, Ile oder Val, Z für die Aminosäuren Val oder Ala steht und  $C_{10-12}$  eine lineare oder verzweigte, gesättigte Alkylkette bedeutet. Erfindungsgemäß handelt es sich bei den Surfactinen der allgemeinen Formel I mit X als Val oder Ile und deren Ester um neue Verbindungen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind.

Es hat sich gezeigt, daß zum Beispiel das vom Stamm *Bacillus subtilis* ATCC 21332 und das vom produktiveren Stamm *Bacillus subtilis* OKB 105 produzierte Surfactingemisch sehr gut zur erfindungsgemäßen Inaktivierung von Viren geeignet ist. Das Surfactin der *Bacillus subtilis*-Stämme ist ein Gemisch aus Isoformen, daß heißt aus Verbindungen der allgemeinen Formel I, die sich untereinander in der Kettenlänge der Fettsäure, in der Verzweigung der Fettsäure und in den Aminosäuren X, Y und Z, wie oben dargestellt, unterscheiden.

Auch Einzelverbindungen der allgemeinen Formel I, so zum Beispiel Surfactinisoformen mit einem Fettsäurerest von  $C_{14}$ -Alkyl oder  $C_{15}$ -Alkyl (daß heißt  $C_{11}$ - oder  $C_{12}$  Alkyl in

der allgemeinen Formel I), die zum Beispiel aus dem durch Fermentation der genannten Stämme erhaltenen Surfactingemisch isoliert oder auch chemisch synthetisiert werden können, zeigen ein hohes Inaktivierungspotential. So wurde festgestellt, daß zum Beispiel Surfactine der allgemeinen Formel I mit C<sub>15</sub>-Alkyl als Fettsäurerest Vesikulärstomatitisvirus (VSV) noch schneller inaktivieren als das Surfactingemisch. Surfactine mit C<sub>14</sub>-Alkyl als Fettsäurerest haben sich als effektive Verbindungen zur Inaktivierung von Schweineherpesvirus (SHV-1) erwiesen.

Erfindungsgemäß eingesetzt werden können auch Pumilacidine der allgemeinen Formel I als Einzelkomponenten oder im Gemisch, wie sie zum Beispiel in Journal of Antibiotics, Japan XLIII 267-280 (1989), Seite 267-280 beschrieben sind sowie deren Salze oder Ester.

In einer spezifischen Ausführungsform werden im erfindungsgemäßen Verfahren Verbindungen der allgemeinen Formel I eingesetzt, deren Aminosäuren Glu und/oder Asp verestert sind. Die Monoester der Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen nur eine der genannten Aminosäuren verestert ist, zeigen ganz spezifische Effekte. So hat sich gezeigt, daß zum Beispiel C<sub>14</sub>-Alkyl-Monoester der allgemeinen Formel I das Schweineherpes-Virus in 20 Minuten bei einer Konzentration von 40 µM um den Faktor >10<sup>4</sup> inaktivieren. C<sub>15</sub>-Alkyl-Monoester der allgemeinen Formel I waren ebenfalls in der Lage, Semliki-Forest-Virus (SFV) in 20 Minuten bei einer Konzentration von 40 µM um den Faktor >10<sup>4</sup> zu inaktivieren. Beispielfhaft sei die Inaktivierung von SFV mit C<sub>14</sub> bzw. C<sub>15</sub>-Alkyl-Monoestern in nachfolgender Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Inaktivierung von SFV

Lipopeptid	Inkubationsdauer (min)					
	0	1	5	10	15	20
	Titer (TCID <sub>50</sub> /ml)					
Monoester C <sub>14</sub>	2,4 * 10 <sup>4</sup>	1,7 * 10 <sup>3</sup>	98,0	30,0	30,0	30,0
Monoester C <sub>15</sub>	2,5 * 10 <sup>5</sup>	173,0	99,0	25,0	10,0	6,5

Im Sinne der Erfindung bedeuten biologische Produkte aus Säugern isolierte Produkte, wie z.B. Blutprodukte und aus Blut isolierte Produkte wie z.B. Impfstoffe und Plasmaderivate. Unter biotechnologischen pharmazeutischen Produkten werden biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe wie z.B. Humanproteine (hGH, TNF, t-PA, EPO) oder Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII) verstanden, wobei die Erfindung jedoch nicht auf die genannten Produkte aus Zellkulturen beschränkt ist.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

### Beispiel 1

#### Herstellung der Surfactine der allgemeinen Formel I

Das erfindungsgemäß eingesetzte Surfactingemisch, das die Verbindungen der allgemeinen Formel I enthält, wird durch Kultivierung von Bacillus subtilis-Stämmen, insbesondere von Bacillus subtilis ATCC 21332 bzw. Bacillus subtilis OKB 105 wie in Biochemical and Biophysical Research

Communications, Vol. 177, Nr. 3 (1991), Seite 998-1005 beschrieben, hergestellt und gereinigt.

**Beispiel 2:**

5

Isolierung der Isoformen aus dem gemäß Beispiel 1  
hergestellten Surfactingemisch

10

Die Isolierung der Einzelverbindungen der allgemeinen Formel I erfolgte durch präparative RP HPLC an EnCa Pharm 100 RP 18-TS (5  $\mu$ m, 250 \* 16 mm) mit Hilfe eines LKB HPLC-Systems. Die Surfactinisoformen wurden mit Hilfe von Acetonitrilgradienten eluiert. Lösungsmittel A enthielt 40% Acetonitril und 60% 10mM  $\text{NH}_4\text{OAC}$ , pH=6,9 (v/v).  
15 Lösungsmittel B war 100% Acetonitril. Die Isoformen wurden nach Lyophilisierung als weißes Pulver erhalten und NMR-spektroskopisch und MS-spektrometrisch bestimmt. Tabelle 2 zeigt die isolierten Verbindungen.

20

25

30

Tabelle 2: Isolierte Isoformen

(In der nachfolgenden Tabelle ist die Aminosäure (AS) in Position 4 Valin und die AS2 ist Leucin, falls nicht anders ausgewiesen)

N° der Fraktion	Aminosäuren	Molekulare Masse in Dalton	Fettsäure-Kettenlänge
1	[Leu7] -	1008	C <sub>13</sub>
2	[Val7] -	994	C <sub>13</sub>
3	[Ile2, Val7] -	994	C <sub>13</sub>
4	[Leu7] -	1022	C <sub>14</sub>
	[Ile7] -	1008	C <sub>13</sub>
5	[Val7] -	1008	C <sub>14</sub>
6	[Ile2, Val7] -	1008	C <sub>14</sub>
7	[Leu7] -	1036	C <sub>15</sub>
8	[Ile7] -	1022	C <sub>14</sub>
9	[Val7] -	1022	C <sub>15</sub>
10	[Ile2, Val7] -	1022	C <sub>15</sub>
11	[Ile7] -	1036	C <sub>15</sub>
12	[Ile2, Ile7] -	1036	C <sub>15</sub>

Bei den Fraktionen 3, 6, 10 und 12 handelt es sich um neue Verbindungen, [Ile2, Val7]- Surfactine und [Ile2, Ile7]- Surfactin, die bisher noch nicht beschrieben wurden. Nachfolgend sind die <sup>1</sup>H-NMR- Daten der Verbindungen in den Fraktionen 10 und 12 bei 30°C in Pyridin-d<sub>5</sub> dargestellt:



Tabelle 3:

Aminosäure	Chemische Verschiebung					
	NH	C <sub>α</sub> H	C <sub>β</sub> H	C <sub>γ</sub> H	C <sub>δ</sub> H	
[Ile2, Val7]Surfactin (Fraktion 10)						
	ppm					
L-Glu(1)	8.84	5.16	2.68,	2.51	2.88	-
L-Ile(2)	9.13	4.71	2.23	1.70,	1.39	1.18
D-Leu(3)	9.23	5.04	2.08,	1.87	1.87	0.93, 0.90
L-Val(4)	8.80	4.86	2.61	1.18		-
L-Asp(5)	9.25	5.60	3.50,	3.35	-	-
D-Leu(6)	8.72	5.20	1.96	1.96		0.90
L-Val(7)	8.88	4.92	2.50	1.12		-
Fettsäure	<sup>3</sup> H 5.50	<sup>2</sup> H 2.98,	2.78	<sup>4</sup> H 2.05,	1.90	<sup>n</sup> H 1.41, 1.25

Aminosäure	Chemische Verschiebung				
	NH	C $\alpha$ H	C $\beta$ H	C $\gamma$ H	C $\delta$ H

[Ile2, Ile7]Surfactin (Fraktion 12)

5

	ppm						
L-Glu(1)	8.80	5.17	2.67,	2.57	2.91	-	
L-Ile(2)	9.10	4.72	2.24	1.70,	1.42	1.18	
D-Leu(3)	9.25	5.04	2.07,	1.86	1.86	0.93,	0.90
L-Val(4)	8.80	4.86	2.63		1.19	-	
L-Asp(5)	9.25	5.63	3.51,	3.38	-	-	
D-Leu(6)	8.75	5.20	1.97		1.97	0.92	
L-Ile(7)	8.84	4.96	2.22	1.70,	1.41	1.12	
Fettsäure		$^1\text{H}$ 5.50	$^2\text{H}$ 3.00,	2.79	$^4\text{H}$ 2.06,	1.92	$^3\text{H}$ 1.43, 1.27

**Beispiel 3:**

10

Herstellung von Monomethylestern der Verbindungen der allgemeinen Formel I

15

Es wurde eine Veresterung des in Beispiel 1 erhaltenen Surfactingemisches mit Methanol/HCl durchgeführt und die einzelnen Monomethylester isoliert. Zur Herstellung der Monomethylester wurden 100 mg Surfactingemisch mit 50 ml Methanol und 5 ml HCl (pH=0,3) für 24 Stunden inkubiert.

Die Mischung wurde bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Verhältnis von Surfactin/Surfactin-Monomethylester/Surfactin-Dimethylester betrug ca. 0,1:2:1. Die Monomethylester wurden mittels präparativer RP HPLC mit derselben Säule, wie in Beispiel 2 beschrieben, isoliert. Der Acetonitrilgradient liegt hier zwischen 35 und 50% B. Tabelle 4 zeigt die isolierten Surfactin-Monomethylester.

Tabelle 4

(In der nachfolgenden Tabelle ist die Aminosäure (AS) in Position 4 Valin und die AS2 ist Leucin, falls nicht anders ausgewiesen)

14	[Val7] -	1008	C <sub>13</sub>
15	[Leu7] -	1022	C <sub>13</sub>
	[Val7] -	1008	C <sub>13</sub>
16	[Leu7] -	1022	C <sub>13</sub>
	[Ile2, Val7] -	1008	C <sub>13</sub>
18	[Ile7] -	1022	C <sub>13</sub>
	[Val2, Val7] -	1008	C <sub>14</sub>
19	[Ile7] -	1022	C <sub>13</sub>
20	[Val7] -	1022	C <sub>14</sub>
21	[Leu7] -	1036	C <sub>14</sub>
22	[Val7] -	1022	C <sub>14</sub>
	[Ile2, Val7] -	1022	C <sub>14</sub>
23	[Leu7] -	1036	C <sub>14</sub>
24	[Ile7] -	1036	C <sub>14</sub>
25	[Val7] -	1036	C <sub>15</sub>

	[Ile7] -	1036	C <sub>14</sub>
26	[Leu7] -	1050	C <sub>15</sub>
	[Val7] -	1036	C <sub>15</sub>
27	[Leu7] -	1050	C <sub>15</sub>
	[Ile2, Val7] -	1036	C <sub>15</sub>
28	[Ile7] -	1050	C <sub>15</sub>
29	[Ile7] -	1050	C <sub>15</sub>
30	[Ile2, Ile7] -	1050	C <sub>15</sub>

**Beispiel 4:**Herstellung von Dimethylestern der Verbindungen der allgemeinen Formel I

5

Die Veresterung von 100 mg des Surfactingemisches aus Beispiel 1 wurde mit 5 ml 37% HCl und 50 ml Methanol in 48 Stunden durchgeführt. Die Diester waren die Hauptprodukte und wurden wie in Beispiel 3 beschrieben isoliert. Tabelle 5 zeigt die isolierten Surfactin-Dimethylester.

10

15

Tabelle 5

34	[Val7] -	1022	C <sub>13</sub>
35	[Leu7] -	1036	C <sub>13</sub>
36	[Ile7] -	1036	C <sub>13</sub>
37	[Val2, Val7] -	1022	C <sub>14</sub>
38	[Val7] -	1036	C <sub>14</sub>
39	[Leu7] -	1050	C <sub>14</sub>
40	[Ile7] -	1050	C <sub>14</sub>
	[Ile2, Val7] -	1036	C <sub>14</sub>
41	[Val7] -	1050	C <sub>15</sub>
42	[Leu7] -	1064	C <sub>15</sub>
43	[Ile7] -	1064	C <sub>15</sub>
	[Ile2, Val7] -	1050	C <sub>15</sub>
44	[Ile2, Ile7] -	1064	C <sub>15</sub>

Für den Diester der Fraktion 37 werden nachfolgend beispielhaft die <sup>1</sup>H-NMR-Daten aufgezeigt, da es sich bei diesem Ester und der dem Ester zugrunde liegenden Isoform des Surfactins um eine neue Verbindung mit der Aminosäure Valin in Position 2 handelt.

Tabelle 6

Aminosäure	Chemische Verschiebung					
	NH	C $\alpha$ H	C $\beta$ H	C $\gamma$ H	C $\delta$ H	
[Val2, Val7] Surfactin-Dimethylester (Fraktion 37)						
	ppm					
L-Glu(1)	8.82	5.01	2.51,	2.39	2.71	-
L-Val(2)	9.05	4.63	2.43		1.20,	-
D-Leu(3)	9.20	5.03	2.06,	1.89	1.89	0.98, 0.91
L-Val(4)	8.75	4.79	2.51		1.14	-
L-Asp(5)	9.16	5.45	3.40,	3.17	-	-
D-Leu(6)	8.52	5.14	1.97		1.97	0.98, 0.91
L-Val(7)	9.03	4.91	2.45		1.13,	-
Fettsäure	$^3\text{H}$ 5.50	$^2\text{H}$ 2.93,	2.73	$^4\text{H}$ 1.99,	1.85	$^n\text{H}$ 1.38, 1.24

**Beispiel 5**Bestimmung der antiviralen Aktivität

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität von zyklischen Lipopeptiden wurden Herpes-Viren mit dem Surfactingemisch aus *Bacillus subtilis* (im weiteren immer als Surfactin bezeichnet) behandelt und zeitabhängig die Anzahl der

infektiösen Viruspartikel durch Aussaat auf frische Wirtszellen (Endstufentitration) bestimmt.

5 1. Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) wurde in 50 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 80 µM Surfactin, sterilfiltriert über Nalgene Spritzenvorfilter mit einer Porenweite von 0,1 µm, aufgenommen. Der Anfangstiter betrug  $5 \times 10^5$  ID<sub>50</sub>/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.

15 2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 µl einer Vero-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml beschickt worden.

25 3. Die Platten wurden 6 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet.

30 4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (ID<sub>50</sub>) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.

35

Innerhalb von 15 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von  $5,1 \times 10^5$  ID<sub>50</sub> auf eine Restinfektiösität von 20 ID<sub>50</sub>. Nach 30 Minuten Inkubationszeit betrug der Titer an infektiösem HSV-1 7 ID<sub>50</sub>. Nach 60 Minuten konnten keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden. Surfactin wirkt stark viruzid auf das Herpes simplex-Virus und ermöglicht eine Inaktivierung von 5 log<sub>10</sub> HSV-1-Partikeln in Serum-haltigem Kulturmedium in weniger als 60 Minuten. Damit nahm die Anzahl der umhüllten infektiösen Viruspartikel bei der Anwendung von Surfactin mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit als bei bisher angewandten Inaktivierungsverfahren ab.

#### Beispiel 6

##### Bestimmung des Wirkungsspektrums

Zur Bestimmung des antiviralen Wirkungsspektrums von zyklischen Lipopeptiden wurden Viren, die u.a. als besonders resistent gegen physikalische und chemische Inaktivierungsmethoden angesehen werden, mit Surfactin behandelt und zeitabhängig die verbliebene Infektiösität der Viruspartikel bestimmt.

1. In 50 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 80 µM Surfactin, sterilfiltriert über Nalgene Spritzenvorfilter mit einer Porenweite von 0,1 µm, wurden die in Tabelle 1 aufgeführten membranumhüllten Viren aufgenommen. Die eingesetzten Anfangstiter sind in Tabelle 1 gezeigt. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.



Tabelle 1: In den Inaktivierungsversuchen verwendete Virus/Zell-Systeme

Virus	Anfangstiter [ID <sub>50</sub> /ml]	Wirtszelllinie	Modellvirus für
Schweine-Herpes-Virus (SHV-1)	$1,6 \times 10^5$	Nerzlungen-Zellen	humane Herpesviren
Bovines-Herpes-Virus (BHV-1)	$4,3 \times 10^5$	Rindernieren-Zellen	humane Herpesviren
Herpes-simplex-Virus Typ2 (HSV-2)	$4,2 \times 10^4$	Affennieren-Zellen	
Immundefizienzvirus von Affen (SIV <sub>aqm</sub> )	$1,6 \times 10^5$	humane T-Helfer-Zellen	humane Immundefizienzviren
Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)	$9,5 \times 10^6$	Babyhamster-Fibroblasten	oft verwendetes Modellvirus
Semliki-Forest-Virus (SFV)	$7,0 \times 10^7$	Babyhamster-Fibroblasten	westliche/östliche Pferdeenzephalitis

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 und 360 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1 : 10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 µl der entsprechenden Wirtszell-Suspension (Tabelle 1) mit Zelldichten von ca.  $1,5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^4$  Zellen/ml, entsprechend der Proliferationsrate der Wirtszelle, beschickt worden.
3. Die Platten wurden je nach Zelllinie 6 bis 18 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellen in den

Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet. Der zytopathogene Effekt von SIV<sub>agm</sub> auf die humane T-Helfer-Zelllinie MOLT 4/8 wurde aufgrund der unzureichenden lichtmikroskopischen Auswertbarkeit entsprechend der Beschreibung des Zellproliferationsabhängigen Tests nach Mosman [J. Immunol. Meth. 65 55-63 1983] mit dem Farbstoff MTT durchgeführt.

4. Die Titer wurden entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 5, berechnet.

Alle aufgeführten umhüllten Viren ließen sich durch die Anwendung von Surfactin in Serum-haltigem Medium inaktivieren. Innerhalb von 120 Minuten waren weniger als 0,02% der eingesetzten Infektiösität von SHV-1, BHV-1 und HSV-2 nachweisbar. Dieser Anteil an Restinfektiösität wurde bei den Viren VSV und SIV<sub>agm</sub> bereits nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten erreicht. Das Lipopeptid Surfactin wirkt direkt auf eine Vielzahl von lipidumhüllten Viren mit hoher Inaktivierungsgeschwindigkeit.

## Beispiel 7

### Einfluß der Lipopeptid-Konzentration

Der Einfluß der Konzentration an zyklischem Lipopeptid auf die Inaktivierungsleistung kann durch die Bestimmung der Inaktivierungsrate (Abnahme der Virusinfektiösität pro Inaktivierungsdauer) quantifiziert werden.

1. Schweine-Herpes-Virus (SHV-1) wurde in 25 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und Surfactinkonzentrationen von

jeweils 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 und 100  $\mu\text{M}$  aufgenommen. Das Surfactin wurde dazu in Kulturmedium gelöst und über Spritzenvorfilter (Nalgene, Porenweite 0,1  $\mu\text{m}$ ) sterilfiltriert. Der Anfangstiter betrug  $2 \times 10^4$  ID<sub>50</sub>/ml. Die Temperatur im permanent gerührten Inaktivierungsansatz betrug 22°C und der pH-Wert 7,8.

2. Aus dem Inaktivierungsansatz wurden nach Zugabe von Surfactin zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten Aliquots entnommen und sofort 1:10 in Medium vorverdünnt.

3. Aus den Vorverdünnungen heraus wurde eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer Nerzungen-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von ca.  $1,0 \times 10^5$  Zellen/ml beschickt worden.

4. Die Inkubation der Zellkulturen in den Mikrotiterplatten, die Auswertung dieser Mikrotiterplatten sowie die Berechnung der Titer an verbliebenem infektiösem Virus zu den jeweiligen Abnahmezeiten wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 4 und 5, durchgeführt.

Die Inaktivierungsrate steigt exponentiell mit der Lipopeptid-Konzentrationen an. Im Bereich der Lipopeptidkonzentrationen von 10 bis 80  $\mu\text{M}$  Surfactin stieg die Inaktivierungsrate von 0,19 auf 0,6 log<sub>10</sub> ID<sub>50</sub>/10 min. Bei einer Surfactin-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurden die eingesetzten infektiösen SHV-1-Partikel mit einer Rate von 1,4 log<sub>10</sub> ID<sub>50</sub>/10 min inaktiviert. Das Lipopeptid Surfactin ermöglicht die Inaktivierung lipidumhüllter Viren in einem weiten Konzentrationsbereich. Die Lipopeptidkonzentration kann

entsprechend den Produkt- und Verfahrenseigenschaften gewählt werden.

5      **Beispiel 8**

Virusinaktivierung                      bei                      verschiedenen  
Reaktionstemperaturen

---

10      Der      Einfluß      der      Temperatur      während      der  
Inaktivierungsreaktion auf die Virusinaktivierung kann  
durch die Bestimmung der Inaktivierungsrate (Abnahme der  
Virusinfektiösität pro Inaktivierungsdauer) quantifiziert  
werden.

15      1. Schweine-Herpes-Virus (SHV-1) wurde in 25 ml  
Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5%  
(v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem  
Kälberserum (GIBCO) und einer Surfactinkonzentrationen  
von 80 µM aufgenommen. Das Surfactin wurde in  
20      Kulturmedium gelöst und über Spritzenvorfilter  
(Nalgene, Porenweite 0,1 µm) sterilfiltriert. Der  
Anfangstiter betrug  $1 \times 10^5$  ID<sub>50</sub>/ml. Der pH-Wert des  
permanent gerührten Inaktivierungsansatzes betrug  
während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl  
25      konstant pH 7,8. Die jeweiligen Inaktivierungsansätze  
wurden auf 5, 10, 15, 20, 25 und 30°C in einem  
Wasserbad [Grant, Modell W14 - ZD/CZ1] mit einer  
Genauigkeit von +/- 0,01°C eingestellt und permanent  
gerührt.

30      2. Aus dem Inaktivierungsansatz wurden nach Zugabe von  
Surfactin zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15 und 20  
Minuten Aliquots entnommen und sofort 1:10 in Medium  
vorverdünnt.

35      3. Aus den Vorverdünnung heraus wurde eine  
Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die  
Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch Flachboden-

Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100 µl einer Nerzlungen-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von ca.  $1,0 \times 10^5$  Zellen/ml beschickt worden.

4. Die Inkubation der Zellkulturen in den Mikrotiterplatten, die Auswertung dieser Mikrotiterplatten sowie die Berechnung der Titer an verbliebenem infektiösem Virus zu den jeweiligen Abnahmezeiten wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1, Abschnitt 4 und 5, durchgeführt.

Im getesteten Temperaturbereich von 5 bis 30°C erfolgte eine deutliche Inaktivierung des SHV-1 im Serum-haltigen Kulturmedium. Die Inaktivierungsrate stieg linear von 0,05 für 5°C über 0,25 für 20°C nach 0,45  $\log_{10}$  ID<sub>50</sub>/min für 30°C an. Mit dem Lipopeptid Surfactin ist die Behandlung von temperaturlabilen Produkten zur Inaktivierung lipidumhüllter Viren wie auch eine zeitsparende schnelle Inaktivierung bei hohen Temperaturen möglich.

#### Beispiel 9

##### Bestimmung der Zytotoxizität von Surfactin auf adhärente Zellen

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der zyklischen Lipopeptide auf adhärente Zellen in Kultur erfolgte in Abwandlung des Kristallviolett-Tests von D.A. Flick und G.E. Gifford [J. Immunol. Meth. 68 167-175 1984].

1. Frisch trypsinierte Zellen der Linien ML (Nerzlungenzellen), CV1 (Nierenzellen der grünen Meerkatze), Hep<sub>2</sub> (humane Epithelzellen), CRFK (Katzen-

Nierenzellen) und BHK21 (Hamster-Nierenzellen) wurden jeweils in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) frisch über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) aufgenommen und 100 µl Zellsuspension (ca.  $1-2 \times 10^5$  Zellen/ml) in jeweils eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Nunc) pipettiert. Die Kultur wurde 3 Stunden bei 37°C in Gegenwart 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet.

2. In Kulturmedium gelöstes Surfactin wurde sterilfiltriert (Nalgene Spritzenvorfilter, Porenweite 0,1 µm) und auf verschiedene Konzentrationen mit frischem Kulturmedium verdünnt. 50 µl des Nährmedium mit verschiedenen Konzentrationen Surfactin wurde zu den angewachsenen Zellen gegeben. Die Kulturplatte wurde weitere 2 Tage bei 37°C und in Gegenwart von 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet.

3. Die Zellen der Linien ML, Hep<sub>2</sub> und BHK21 waren nach 3 Tagen, die Zellen der Linien CV1 und CRFK nach 8 Tagen in den Kontrollreihen zu hohen Zelldichten herangewachsen und bildeten einen homogenen Zellrasen. Der Mediumüberstand wurde abgeschlagen und zu jedem Ansatz 50 µl Kristallviolettlösung pipettiert. Die Kristallviolettlösung setzte sich zusammen aus 3,75 g Kristallviolett, 1,75 g NaCl, 161,5 ml Ethanol abs., 43,2 ml 37%igem Formaldehyd (alle Chemikalien von Merck) ad 500 ml deionisiertes und destilliertes Wasser. Die Kristallviolettlösung wurde nach 20 min intensiv aus den Kavitäten mit deionisiertem Wasser herausgewaschen und die Mikrotiterplatte an der Luft getrocknet.

4. Der verbleibende zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl einer Lösung aus 50% Ethanol abs., 0,1% Eisessig, 49,9% deionisiertem und destilliertem Wasser je Kavität in Lösung gebracht und durch intensives Schütteln über 5 Minuten homogen verteilt. Die photometrische Bestimmung der Farbintensität, die

in linearem Zusammenhang zur Zelldichte steht, erfolgte bei 550 nm (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments). Es wurde die Konzentration ermittelt, die eine Reduzierung der Zellzahl um 50% bewirkte.

Es konnte für das Surfactin ein zytotoxischer Effekt von 50% bei einer Mediumkonzentration von 48  $\mu\text{M}$  für die Hep<sub>2</sub>-, von 37  $\mu\text{M}$  für die BHK21-, von 45  $\mu\text{M}$  für die CRFK- und von 43  $\mu\text{M}$  für die ML-Zellen ermittelt werden. Die CRFK- und Hep<sub>2</sub>-Zellen zeigten bei Konzentrationen bis zu 30  $\mu\text{M}$  Surfactin keine Veränderungen am Zellwachstum. Bei den ML- und BHK21-Zellen wurde bei dieser Surfactin-Konzentration eine Wachstumsverringering um 15% beobachtet. Die in Beispiel 1 angewandte Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  Surfactin bewirkte in Langzeituntersuchungen eine Reduzierung der Zelldichte auf 15% bei den CRFK- und Hep<sub>2</sub>-Zellen, auf 45% bei den ML-Zellen und auf 57% bei den BHK21-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen. Keine der getesteten Kulturen tolerierte höhere Surfactin-Konzentrationen als 65  $\mu\text{M}$ . Alle getesteten Zellkulturen tolerieren die Anwesenheit des Lipopeptids Surfactin über den für eine Inaktivierung von lipidumhüllten Viren notwendigen kurzen Zeitraum.

#### Beispiel 10

##### Biotechnologische Anwendung

##### Inaktivierung von umhüllten Viren in Zellkulturen

Mit Hilfe der Gentechnik kann jede beliebige Zelllinie potentiell wertvolle Substanzen wie Interferone, Wachstumsfaktoren, u.a. produzieren. Diese Zellkulturen können unter Umständen mit verschiedenen Virusspezies kontaminiert sein. Viruskontaminationen sollten daher schon in der Ausgangszellkultur entfernt werden. Als Beispiel wird hier die Eliminierung eines Herpesvirus aus

einer Nerz-Lungenzellkultur beschrieben. Schweine-Herpesvirus Typ 1 (SHV-1) induziert einen deutlichen zytopathogenen Effekt, an dessen Ausbleiben der Inaktivierungserfolg direkt sichtbar wird.

5 1. Ca.  $1 \times 10^4$  frisch trypsinisierte ML-Zellen (Nerz-Lungenzellen) wurden in einer Petrischale (10 cm Ø, Nunc) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) passagiert. Das  
10 Zellkulturmedium wurde von den angewachsenen Zellen entfernt und diese mit ca. 100 TCID<sub>50</sub> SHV-1 infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation wurde das Inoculum abgenommen und der Zellrasen mit 10 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5%  
15 (v/v) fötalem Kälberserum (GIBCO) und 50 µM Surfactin überschichtet. Das Surfactin wurde dazu in einer Konzentration von 1 mM in PBS gelöst und autoklaviert (123°C über 23 min).

2. Die ML-Zellkultur wurde 3 Tage bei 37°C und 5 Vol.-%  
20 CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellen bedeckten 30% des Petrischalenbodens und konnten mit 0,25% Trypsin, 2 µM EDTA, abgelöst werden. Alle Zellen wurden erneut in eine Petrischale (10 cm Ø, Nunc) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (ICN) mit 5% (v/v) über  
25 30 min bei 56°C inaktiviertem fötalem Kälberserum (GIBCO) und 40 µM Surfactin passagiert. Die Behandlung wurde zweimal wiederholt.

3. Nach anschließender zehnmaliger Passage ohne Surfactin wurde 1 ml des Zellkulturüberstandes auf eine frische  
30 ML-Kultur gegeben und diese nach 7 Tagen Inkubation auf einen Virus-bedingten zytopathogenen Effekt (CPE) mit dem Lichtmikroskop untersucht.

In den ML-Zellkulturen wurde kein zytopathogener Effekt  
35 als Marker der Virusvermehrung beobachtet.



**Beispiel 11**

Produktsicherheit

5 Inaktivierung von SIV in einer Albuminlösung

Serum enthält eine Vielzahl von wirtschaftlich und medizinisch bedeutsamen Bestandteilen, z. B. Hormone, Immunglobuline, Gerinnungsfaktoren, Enzyme, Cholesterine, Lipoproteine, Albumine u.a.. Serum kann mit organischen  
10 Lösungsmitteln, wie Ethanol, Ether, Polyethylenglycol bei niedrigen Temperaturen und durch Präzipitation mit Salzen oder pH-Veränderungen fraktioniert und so die Bestandteile aufgereinigt werden. In Blut vorkommende Viren, wie das Retrovirus HIV, können jedoch als  
15 infektiöse Partikel in das aufgereinigte Blutprodukt gelangen. Als Beispiel für eine sich notwendigerweise anschließende Virusinaktivierung wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit Surfactin behandelt. Zur Demonstration des Wirkungspotentiales wurde das Albumin mit einer Dosis des  
20 Affenimmundefizienzvirus (SIV) versetzt, die unter natürlichen Bedingungen nicht gefunden wird, und zeitabhängig die Anzahl der infektiösen Viruspartikel durch Aussaat auf frische Wirtszellen (Endstufentitration) bestimmt.

25 1. Affenimmundefizienzvirus (SIV) wurde in 50 ml PBS mit 50 mg/ml BSA und 80  $\mu$ M Surfactin (gelöst in PBS in einer Konzentration von 1 mM und autoklaviert) aufgenommen. Der Anfangstiter betrug  $1,6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes  
30 betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8 und die Temperatur 22°C.

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen  
35 Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus

- eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100  $\mu$ l einer jeden Verdünnungsstufe überführt.
- 5 Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100  $\mu$ l einer Molt4, Klon 8-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml beschickt worden.
3. Die Platten wurden 14 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne
- 10 Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurde als infiziert gewertet.
- 15 4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (TCID<sub>50</sub>) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf
- 20 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.
- Innerhalb von 15 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von  $1,6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> auf eine Restinfektiösität von  $1,5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>. Nach 60 Minuten Inkubationszeit betrug der Titer an infektiösem SIV 7 TCID<sub>50</sub>. Nach 120 Minuten konnten
- 25 keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden.

## Beispiel 12

### Produktsicherheit

#### 30 Kombinierte Anwendung von Surfactin und feuchter Hitze zur Inaktivierung von SIV in einer Albuminlösung

Blut- und biotechnologisch erzeugte Produkte werden im isolierten und gereinigten Zustand häufig einer

35 Hitzebehandlung (Pasteurisierung) unterzogen. Diese Hitzebehandlung kann mit einem SD-Verfahren kombiniert

werden. Surfactin ist aufgrund seiner Thermostabilität ebenfalls in Kombination mit einem Hitzeinaktivierungsverfahren einsetzbar. Das Beispiel beschreibt die Inaktivierung des Affenimmundefizienzvirus (SIV) in Serumalbumin zur Demonstration des synergistischen Effektes von Hitze und Surfactin bei der Virusinaktivierung.

1. Affenimmundefizienzvirus (SIV) wurde in 50 ml PBS mit 50 mg/ml BSA und 80  $\mu$ M Surfactin (gelöst in PBS in einer Konzentration von 1 mM und autoklaviert) aufgenommen. Der Anfangstiter betrug  $1,6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Der pH-Wert des Inaktivierungsansatzes betrug während der Versuchsdauer durch Zugabe von 1 N HCl konstant pH 7,8. Vor der Zugabe der Virussuspension wurde der Ansatz in einem Wasserbad auf 60°C vortemperiert und während des Experiments konstant gehalten.

2. Aus dem permanent gerührten Inaktivierungsansatz wurden zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, und 60 Minuten Aliquots entnommen. Von diesen Aliquots wurde aus einer 1:10 Vorverdünnung heraus eine Verdünnungsreihe zur Basis 3 erstellt. Die Verdünnungen wurden auf eine 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) in 8 parallele Reihen mit jeweils 100  $\mu$ l einer jeden Verdünnungsstufe überführt. Die 96 Löcher der Mikrotiterplatte waren zuvor mit jeweils 100  $\mu$ l einer Molt4, Klon 8-Zell-Suspension mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml beschickt worden.

3. Die Platten wurden 14 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellen in den Kontrollansätzen ohne Virusverdünnung waren zu hohen Dichten herangewachsen. Die Zellkulturen der Mikrotiterplatte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Jede Kultur mit Anzeichen eines zytopathogenen Effektes wurden als infiziert gewertet.

4. Die Titer wurden als 50%ige infektiöse Dosis (TCID<sub>50</sub>) nach der Methode von Spearman und Kärber [in: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. (1974) Ed. L. Cavalli-Sforza. Gustav Fischer-Verlag Stuttgart S. 171-173] berechnet und auf 1 ml des Inaktivierungsansatzes bezogen.

Innerhalb von 5 Minuten reduzierte sich der Anfangstiter von  $1,6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> auf eine Restinfektiösität von  $9,3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>. Nach einer 20 minütigen Inkubation konnten keine infektiösen Partikel mehr gefunden werden. Beim kombinierten Hitze/Surfactin-Verfahren wurde die Infektiösität des eingebrachten SIV mindestens um einem Faktor 10 schneller inaktiviert als durch die gleiche Surfactinkonzentration bei Raumtemperatur oder durch Hitzebehandlung ohne antivirale Zusätze.

### Beispiel 13

#### Maximale Inaktivierungsraten:

Für drei Virusfamilien wurden die maximal erreichbaren Inaktivierungsraten bestimmt. Die Inaktivierungsbedingungen waren: pH 7,8; 80 µM Surfactin; in wässrigem Medium mit 5% fötalem Kälberserum; gerührt; 22°C.

Virus	Abnahme der Infektiösität [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> <sup>#</sup> ]			
	nach 5 min	nach 30 min	nach 60 min	nach 120 min
Herpesviren	2,30	4,90	5,40	-
Retroviren	1,30	2,90	4,40	-
Rhabdoviren	1,00	3,60	4,50	5,40

# 50% Gewebekultur infizierende Dosis

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren  
5 in biologischen oder biotechnologischen Produkten  
oder in Zellkulturen,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
den Produkten oder Zellkulturen als  
10 Inaktivierungagens ein zyklisches Lipopeptid, dessen  
Salze oder Ester oder Gemische davon zugesetzt und  
die Inaktivierung bei Raumtemperatur innerhalb von 30  
Minuten bis maximal 2 Stunden durchgeführt wird,  
wobei
- 15 a) bei der Inaktivierung von Viren in den Produkten  
das Agens den Produkten in einer Konzentration von 1-  
100µM zugesetzt wird oder
- 20 b) bei der Inaktivierung von Viren in den  
Zellkulturen dem serumfreien Kulturmedium das Agens  
in einer Konzentration von 1-65µM oder dem  
serumhaltigen Kulturmedium in einer Konzentration von  
10-100µM zugesetzt wird.
- 25
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Virusinaktivierung in biologischen oder  
biotechnologischen Produkten bei höheren Temperaturen  
30 als Raumtemperatur, vorzugsweise 30 - 60°C, innerhalb  
von 5 - 30 min durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

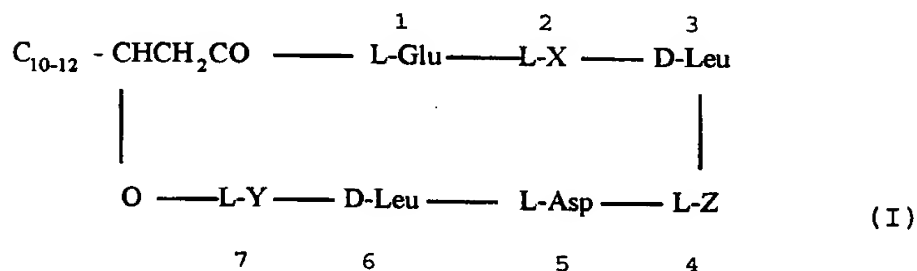
dadurch gekennzeichnet,

daß als zyklische Lipopeptide natürlich vorkommende,  
chemisch synthetisierte, gentechnisch hergestellte  
oder gentechnisch modifizierte Lipopeptide eingesetzt  
werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Lipopeptide Lipoheptapeptide der allgemeinen  
Formel I



deren Salze oder Ester oder deren Gemische eingesetzt  
werden, wobei in Formel I X und Y unabhängig  
voneinander für die Aminosäuren Leu, Ile oder Val und  
Z für die Aminosäuren Val oder Ala steht und  $C_{10-12}$   
eine lineare oder verzweigte, gesättigte Alkylkette  
bedeutet.

5. Verfahren nach Anspruch 4,

dadurch gekennzeichnet,

daß Verbindungen der allgemeinen Formel I mit  $C_{11}$ -  
Alkyl oder  $C_{12}$ -Alkyl eingesetzt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Ester der Verbindungen der allgemeinen Formel  
I eingesetzt werden, vorzugsweise die Monoester.

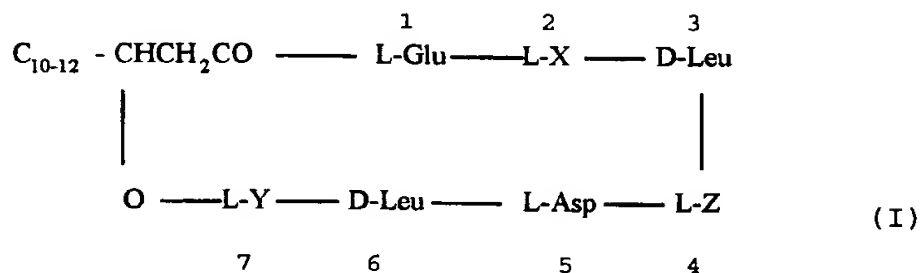
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Verbindungen der allgemeinen Formel I mit X und Y  
in der Bedeutung von Leu und Z in der Bedeutung von  
Val eingesetzt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Verbindungen der allgemeinen Formel I mit X in  
der Bedeutung von Ile oder Val eingesetzt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß lipidumhüllte humane und animale Viren  
inaktiviert werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Herpes-Viren, vorzugsweise HSV-1, HSV-2, BHV-1,  
SHV-1, Imundefizienz-Viren, vorzugsweise HIV-1, HIV-  
2, SIV<sub>agm</sub>, das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) und  
das Semliki-Forest-Virus (SFV) inaktiviert werden.

## 11. Neue Lipopeptide der allgemeinen Formel I



sowie deren Salze und Ester, wobei in Formel I X und Y unabhängig voneinander Val oder Ile bedeuten und Z Val ist.

12. Verwendung der Lipopeptide gemäß Anspruch 11 zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren in biologischen oder biotechnologischen Produkten oder in Zellkulturen.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 97/04353

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N.. NARUSE ET AL.: "Pumilacidin, a Complex of new Antiviral Antibiotics" JOURNAL OF ANTIBIOTICS., vol. 43, no. 3, March 1990, TOKYO JP, pages 267-280, XP002049159 cited in the application see page 274, paragraph 3 - page 275, paragraph 1; figure 6; tables 4,5 --- -/--	1,3-6, 9-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 1997

Date of mailing of the international search report

23/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04353

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. ITOKAWA ET AL.: "Structural and Conformational Studies of 'Ile7! and 'Leu7! Surfactings from Bacillus subtilis natto" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 42, no. 3, March 1994, TOKYO JP, pages 604-607, XP002049160 cited in the application see page 607, left-hand column, paragraph 2; figure 1	1,3-6, 9-12
X	WO 95 32990 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO ;HIRAMOTO SHIGERU (JP); SAITO YUKIO (JP);) 7 December 1995	11
P,X	-& EP 0 761 682 A see claims; examples	11
A	B. HOROWITZ ET AL.: "Inactivation of Lipid-Enveloped Viruses in Labile Blood Derivatives by Unsaturated Fatty Acids" VOX SANGUINIS, vol. 54, no. 1, 1988, pages 14-20, XP002049158 see page 18, left-hand column, paragraph 1 - page 19, left-hand column, paragraph 1; table 1	1
A	US 4 841 023 A (HOROWITZ BERNARD) 20 June 1989 see claims; examples	1
P,A	DE 195 21 938 A (VOLLENBROICH DIRK DIPL ING ;VATER JOACHIM PRIV DOZ DR (DE); PAULI) 19 December 1996 see claims; examples	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No

PCT/EP 97/04353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9532990 A	07-12-95	EP 0761682 A	12-03-97
US 4841023 A	20-06-89	NONE	
DE 19521938 A	19-12-96	NONE	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07K7/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	N. NARUSE ET AL.: "Pumilacidin, a Complex of new Antiviral Antibiotics" JOURNAL OF ANTIBIOTICS., Bd. 43, Nr. 3, März 1990, TOKYO JP, Seiten 267-280, XP002049159 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 274, Absatz 3 - Seite 275, Absatz 1; Abbildung 6; Tabellen 4,5 --- -/--	1,3-6, 9-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/12/1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H. ITOKAWA ET AL.: "Structural and Conformational Studies of 'Ile7! and 'Leu7! Surfactings from Bacillus subtilis natto" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 42, Nr. 3, März 1994, TOKYO JP, Seiten 604-607, XP002049160 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 607, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1	1,3-6, 9-12
X	WO 95 32990 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO ;HIRAMOTO SHIGERU (JP); SAITO YUKIO (JP);) 7.Dezember 1995	11
P,X	-& EP 0 761 682 A siehe Ansprüche; Beispiele	11
A	B. HOROWITZ ET AL.: "Inactivation of Lipid-Enveloped Viruses in Labile Blood Derivatives by Unsaturated Fatty Acids" VOX SANGUINIS, Bd. 54, Nr. 1, 1988, Seiten 14-20, XP002049158 siehe Seite 18, linke Spalte, Absatz 1 - Seite 19, linke Spalte, Absatz 1; Tabelle 1	1
A	US 4 841 023 A (HOROWITZ BERNARD) 20.Juni 1989 siehe Ansprüche; Beispiele	1
P,A	DE 195 21 938 A (VOLLENBROICH DIRK DIPL ING ;VATER JOACHIM PRIV DOZ DR (DE); PAULI) 19.Dezember 1996 siehe Ansprüche; Beispiele	1

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der oben Patentfamilie gehören

Inventar des Aktenzeichens

PCT/EP 97/04353

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9532990 A	07-12-95	EP 0761682 A	12-03-97
US 4841023 A	20-06-89	KEINE	
DE 19521938 A	19-12-96	KEINE	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>P28696PC-Zie</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 97/ 04353</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>11/08/1997</b>
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/08/1996</b>	
Anmelder  <b>VOLLENBROICH, Dirk et al.</b>	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
  - Abb. Nr. ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
  - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K7/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	N. NARUSE ET AL.: "Pumilacidin, a Complex of new Antiviral Antibiotics" JOURNAL OF ANTIBIOTICS., Bd. 43, Nr. 3, März 1990, TOKYO JP, Seiten 267-280, XP002049159 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 274, Absatz 3 - Seite 275, Absatz 1; Abbildung 6; Tabellen 4,5 --- -/--	1,3-6, 9-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/12/1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H. ITOKAWA ET AL.: "Structural and Conformational Studies of 'Ile7! and 'Leu7! Surfactings from Bacillus subtilis natto" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 42, Nr. 3, März 1994, TOKYO JP, Seiten 604-607, XP002049160 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 607, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 ---	1,3-6, 9-12
X	WO 95 32990 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO ;HIRAMOTO SHIGERU (JP); SAITO YUKIO (JP);) 7.Dezember 1995 --- P,X -& EP 0 761 682 A siehe Ansprüche; Beispiele	11  11
A	B. HOROWITZ ET AL.: "Inactivation of Lipid-Enveloped Viruses in Labile Blood Derivatives by Unsaturated Fatty Acids" VOX SANGUINIS, Bd. 54, Nr. 1, 1988, Seiten 14-20, XP002049158 siehe Seite 18, linke Spalte, Absatz 1 - Seite 19, linke Spalte, Absatz 1; Tabelle 1 ---	1.
A	US 4 841 023 A (HOROWITZ BERNARD) 20.Juni 1989 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1
P,A	DE 195 21 938 A (VOLLENBROICH DIRK DIPL ING ;VATER JOACHIM PRIV DOZ DR (DE); PAULI) 19.Dezember 1996 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 97/04353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9532990 A	07-12-95	EP 0761682 A	12-03-97
US 4841023 A	20-06-89	NONE	
DE 19521938 A	19-12-96	NONE	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

4

Applicant's or agent's file reference P28696PC-Zie	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP97/04353	International filing date (day/month/year) 11 August 1997 (11.08.1997)	Priority date (day/month/year) 12 August 1996 (12.08.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 7/06		
Applicant VOLLENBROICH, Dirk		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 February 1998 (03.02.1998)	Date of completion of this report 14 May 1998 (14.05.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP97/04353

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1 - 32, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1 - 12, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04353

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

- D1: Journal of Antibiotics, Vol. 43 No. 3, pp. 267-280 (1990)
- D2: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 42 No. 3, pp. 604-607 (1994)
- D3: WO-A-95/32990 and EP-A-0 761 682 ("P" document)
- D4: Vox Sanguinis, Vol. 54 No. 1, pp. 14-20 (1988)
- D5: US-A-4 841 023

The application relates to antiviral lipopeptides and to a method for inactivating lipid-enveloped viruses using lipopeptides.

Neither the method nor the claimed cyclic lipopeptides are known from the prior art. The subject matter of Claims 1-12 is therefore novel in the sense defined by PCT Article 33(2).

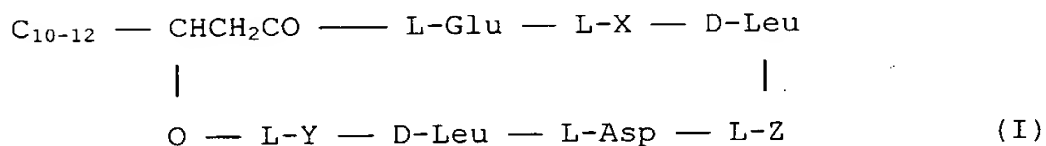
Documents D1 and D2 describe the antiviral behaviour of pumilacidins and [Ile<sup>7</sup>] and [Leu<sup>7</sup>] surfactins against HSV and HI viruses. Document D3 discloses cyclic lipopeptides with different amino acid sequences, and furthermore contains no indication of the stereochemistry of the amino acids. Document D4, which is considered to be the closest

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

prior art, discloses the inactivation of lipid-enveloped viruses in labile blood derivatives by unsaturated fatty acids (e.g. oleic acid, linolenic acid, linoleic acid, arachidonic acid). Document D5 deals with the inactivation of viruses in labile protein-containing compositions using long-chain fatty acids (e.g. linoleic acid, arachidonic acid, elaidic acid, palmitic acid, etc.).

The problem addressed by the present application can be considered to be that of providing further substances which are suitable as virus inactivating agents for labile products and which can be used in processes for accomplishing this purpose.

The solution is in the form of cyclic lipopeptides of the general formula



Although D1 and D2 suggest the antiviral effect of structurally similar substances belonging to the surfactin class, it is not obvious to a person skilled in the art that the claimed compounds can be used in the described manner as inactivating agents for a large number of lipid-enveloped viruses. The closest prior art does disclose the inactivating potential of long-chain fatty acids against lipid-enveloped viruses, but does not provide any indication that it might be possible to equip suitably structured lipopeptides with this potential.

Hence all the claims can be considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).





# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D	18 MAY 1998
WIPO	PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>P28696PC-Zie</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP97/04353</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>11/08/1997</b>	Priority date (Tag/Monat/Jahr) <b>12/08/1996</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C07K7/06</b>		
Anmelder <b>VOLLENBROICH, Dirk et al.</b>		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  <b>03/02/1998</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  <b>14.05.98</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Döpfer, K-P</b>  Telefon (+49-89) 2399-8547 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/04353

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-32 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-12 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung,      Seiten:

☐ Ansprüche,      Nr.:

☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-12
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-12
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-12
	Nein: Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: J. Antibiot. **43**(3):267-280(1990)
- D2: Chem. Pharm. Bull. **42**(3):604-607(1994)
- D3: WO-A-95/32990 & EP-A-761 682 (P-Dokument)
- D4: Vox Sang. **54**(1):14-20(1988)
- D5: US-A-4,841,023

1. **Punkt V:**

Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf antivirale Lipopeptide sowie ein Verfahren zur Inaktivierung von lipidumhüllten Viren mittels Lipopeptiden.

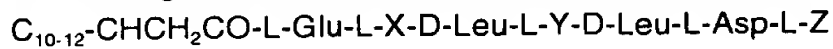
Sowohl das Verfahren als auch die beanspruchten zyklischen Lipopeptide sind aus dem Stand der Technik nicht bekannt. Daher ist der Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 1-12 als neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT anzusehen.

D1 und D2 beschreiben die antivirale Aktivität von Pumilacidinen bzw. [Ile<sup>7</sup>]- und [Leu<sup>7</sup>]-Surfactinen gegenüber HSV bzw. HI-Viren. D3 offenbart zyklische Lipopeptide mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz. Außerdem sind keinerlei Hinweise auf die Stereochemie der Aminosäuren vorhanden. D4, welches als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart die Inaktivierung von lipidumhüllten Viren in empfindlichen Blutderivaten durch ungesättigte Fettsäuren (z.B. Ölsäure, Linolensäure, Linolsäure, Arachidonsäure). D5 behandelt die Inaktivierung von Viren in labilen, proteinhaltigen Zusammensetzungen mittels langkettiger Fettsäuren (z.B. Linolsäure, Arachidonsäure, Elaidinsäure, Palmitinsäure etc.).

Das der vorliegenden Anmeldung zugrunde liegende Problem kann darin gesehen werden, weitere Substanzen zur Verfügung zu stellen, die als virusinaktivierendes Agens für empfindliche Produkte geeignet sind und in entsprechenden Verfahren zum Einsatz kommen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Die Lösung sind zyklische Lipopeptide der allgemeinen Formel



O-

(I)

Obwohl aus D1 und D2 die antivirale Wirkung von strukturell ähnlichen Substanzen aus der Klasse der Surfactine hervorgeht, ist es für den Fachmann nicht ersichtlich, daß die beanspruchten Verbindungen sich in der beschriebenen Weise als Inaktivierungsmittel für eine Vielzahl von Viren mit Lipidhüllen eignen. Der nächstliegende Stand der Technik offenbart zwar die Inaktivierungspotenz langkettiger Fettsäuren gegenüber Viren mit Lipidhülle, gibt jedoch keinen Hinweis, daß diese Potenz auch auf entsprechend strukturierte Lipopeptide übertragbar wäre.

Damit sind alle Ansprüche als erfinderisch gegenüber dem Stand der Technik anzusehen (Artikel 33(3) PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/04353

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C07K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N. NARUSE ET AL.: "Pumilacidin, a Complex of new Antiviral Antibiotics" JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 43, no. 3, March 1990, TOKYO JP, pages 267-280, XP002049159 cited in the application see page 274, paragraph 3 - page 275, paragraph 1; figure 6; tables 4,5  --- -/--	1,3-6, 9-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents :**

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 1997

Date of mailing of the international search report

23/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.  
PCT/EP 97/04353

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. ITOKAWA ET AL.: "Structural and Conformational Studies of 'Ile7' and 'Leu7' Surfactings from <i>Bacillus subtilis</i> natto" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 42, no. 3, March 1994, TOKYO JP, pages 604-607, XP002049160 cited in the application see page 607, left-hand column, paragraph 2; figure 1	1,3-6, 9-12
X	WO 95 32990 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO ;HIRAMOTO SHIGERU (JP); SAITO YUKIO (JP);) 7 December 1995	11
P,X	-& EP 0 761 682 A see claims; examples	11
A	B. HOROWITZ ET AL.: "Inactivation of Lipid-Enveloped Viruses in Labile Blood Derivatives by Unsaturated Fatty Acids" VOX SANGUINIS, vol. 54, no. 1, 1988, pages 14-20, XP002049158 see page 18, left-hand column, paragraph 1 - page 19, left-hand column, paragraph 1; table 1	1
A	US 4 841 023 A (HOROWITZ BERNARD) 20 June 1989 see claims; examples	1
P,A	DE 195 21 938 A (VOLLENBROICH DIRK DIPL ING ;VATER JOACHIM PRIV DOZ DR (DE); PAULI) 19 December 1996 see claims; examples	1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

WO 9532990 A	07-12-95	EP 0761682 A	12-03-97
--------------	----------	--------------	----------

US 4841023 A	20-06-89	NONE	
--------------	----------	------	--

DE 19521938 A	19-12-96	NONE	
---------------	----------	------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**